ринарная патология. 2005. № 4. С. 116-118.
5. Ю.Н. Федоров Иммунокоррекция: применение и механизм действия иммуномодулирующих препаратов // Ветеринария. 2005. № 2. С. 3-6.
6. Ю.Н. Федоров. Иммунодефициты крупного рогатого скота // Ветеринария. 2006. № 1. С. 3-6.
7. А.Г. Шахов. Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Матер. Научно-практ. конф. Воронеж. 2002. С. 3-8.
8. Edwards S. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle // Scientific and Technical REVIEW. 1990. Vol. 9. № 1. P. 115-150.

УДК 619:612.017.1

В.С. Власенко, М.А. Бажин, А.Н. Новиков, Е.М. Шулико
Всероссийского научно-исследовательского института бруцеллеза и туберкулеза животных, ВНИИ бруцеллеза и туберкулеза животных

ОЦЕНКА ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ НА ИХ СПОСОБНОСТЬ ВОССТАНАВЛИВАТЬ УТРАЧЕННУЮ ИММУНОЛОГИЧЕСКУЮ РЕАКТИВНОСТЬ

Известно, что иммунная система является первой мишенью при воздействии на организм вредных факторов физического, химического, биологического генеза. В отличии от этого, патогенные микроорганизмы, условно-патогенная микрофлора, обладая уникальной способностью к изменчивости и адаптации, могут повышать свою вирулентность, способность преодоления естественных защитных барьеров. Указанные факторы влияют на становление иммунной системы на ранних этапах онтогенеза, обусловливая у плода и новорожденного нарушение в ней, сопровождающееся снижением иммунного ответа, развитием толерантности, иммунодефицитных состояний (Ю.Н. Федоров, О.А. Верховский, 1996).

В научной литературе описаны факторы, вызывающие утрату иммунологической толерантности (ареактивности), которые в основном относятся к двум группам: 1-я группа – неспецифические факторы, стимулирующие иммунный ответ толерантных животных; 2-я группа – специфические по отношению к антигену, вызвавшему толерантность (Л.Н. Фонталин, Л.А. Певницкий, 1978).

Иммуномодулирующие свойства известных и вновь синтезируемых средств определяют оценкой иммунного статуса как гуморального, так и клеточного у человека или животных до и после их применения: в крови определяют общее количество Т-лимфоцитов и их субпопуляций; количество В-лимфоцитов; количество иммуноглобулинов основных изотипов G, M, A, пролиферативную активность Т-лимфоцитов на ФГА в реакции бластной трансформации (РБТ); соотношение Т-хелперов/Т-супрессоров и другие иммунологические показатели.

Однако, составление иммунограммы, для определения иммунного статуса и оценки эффективности иммуномодулирующих средств является трудоемким и дорогостоящим исследованием.

Также при оценке иммунного статуса нельзя не учитывать, что одно и то же состояние организма или любой его системы может быть достигнуто множеством вариантов сочетаний параметров отдельных компонентов. Какой вариант будет реализован в каждом конкретном случае, зависит не только от генетических особенностей индивида, но и от набора внешних факторов – закономерных и случайных, благоприятных и неблагоприятных. Это положение также затрудняет более объективную оценку иммуномодулирующей эффективности изучаемых препаратов.

Цель настоящего сообщения – показать преимущества оценки иммуномодулирующих препаратов на способность их восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность.

Материал и методы

Иммуномодулирующие свойства препаратов изучали с помощью оценки иммунного статуса по определению в крови морских свинок наиболее активных иммунокомпетентных клеток: определение количества в тесте Е-рок – Т-лимфоцитов; EAC-рок – В-лимфоцитов; ЕА-рок – лимфоцитов-килле-

ров; ЕТ-рок (туберкулиновые) – антигенреактивных лимфоцитов и нейтрофилов. Отбор проб крови проводили через 30 дней после иммунизации и 30 дней после экспериментального заражения. Число иммунокомпетентных клеток определяли в абсолютном содержании (тыс./мкл). При анализе результатов патологоанатомического исследования морских свинок определяли показатель интенсивности поражений, используя схему Г.И. Гельберга, Е.А. Финкеля (1959), а для оценки напряженности иммунитета применяли индекс защиты, предложенный А.И. Тогуновой (1948).

Результаты исследований

Проведены исследования на 25 морских свинках по определению продолжительности состояния иммунологической толерантности у животных, вызванной ППД-туберкулином для млекопитающих, обработанного формалином по прописи А.А. Евглевского (1993), по мнению которого реакция формальдегид – белок (пептид) состоит из двух стадий. В течение первой стадии, быстрой и необратимой, происходит взаимодействие формальдегида с аминогруппами белка и особенно лизина с образованием метилоламинной группы. На втором этапе в реакции участвуют активные радикалы циклических аминокислот, содержащие фенольные, гуанидиновые и индольные группы. Наибольшее значение имеет соединение через формальдегид свободных аминогрупп лизина с СН-группами ядер тирозина и гистидина, которые характеризуются большой стойкостью. В результате блокирования свободных аминогрупп происходит увеличение отрицательных зарядов аллергенов, что снижает аллергическое действие препаратов.

С целью индукции у морских свинок иммунологической толерантности 20-ти животным ввели аллерген – ППД-туберкулин для млекопитающих, обработанный 0,5-0,7% раствором формалина, в течение 5-9 дней при 37° С, подкожно в дозе 1,5 мл. Затем 20 морских свинок разделили на 5 групп по 4 в каждой. Животных 1-й группы иммунизировали вакциной БЦЖ внутрикожно в дозе 0,1 мг в 0,1 мл физиологического раствора через 3 дня после толерогенной обработки; 2-ой – через 7 дней; 3-ей – через 14 дней; 4-ой – через 21 день; 5-ой – через 28 дней. Морских свинок 6-ой группы (5 животных) иммунизировали вакциной БЦЖ без предварительной толерогенной обработки. Всех морских свинок исследовали ППД-туберкулином через 30 дней после вакцинации.

Результаты кожной аллергической реакции на ППД-туберкулин для млекопитающих представлены в таблице 1.

Из таблицы видно, что у морских свинок восстановление утраченной иммунологической реактивности начинается с 21 дня после толерогенной обработки. В течение первых двух недель после толерогенной обработки морские свинки не отвечают на вакцину БЦЖ кожной аллергической реакцией на ППД-туберкулин для млекопитающих. Следовательно, в эти сроки можно испытывать препараты на способность устранять у животных толерантное состояние. Таким образом, оптимальным сроком введения вакцины БЦЖ являются 14-16 день после введения ППД-туберкулина или 7-10 день после введения иммуномодулятора.

Далее мы провели сравнительную оценку иммуномодулирующих препаратов, оценивая иммунологические реакции, и способность восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность. Для проведения эксперимента использовали: ронколейкин, полиоксидоний, поливинилпирролидон. Ронколейкин – рекомбинант-

Таблица 1

Кожная аллергическая реакция у морских свинок на вакцину БЦЖ после толерогенной обработки

Группы животных	Количество животных	Сроки введения БЦЖ животным после толерогенной обработки	Кожная реакция на ППД-туберкулин через 30 дней после вакцинации, мм	
			Реагирующих животных	M±m
1	4	через 3	-	
2	4	7	-	
3	4	14	-	
4	4	21	2	6,25±3,66
5	4	28	3	10,0±3,56
6	5	за 30 дней до исследования ППД-туберкулином	5	16,4±3,47

Таблица 2

Результаты оценки иммуномодулирующих свойств препаратов на толерантных морских свинках

№ группы	Сроки исследования	Препарат	Символы статистики	Иммунокомпетентные клетки				
				Е-рок	ЕАС-рок	ЕА-рок	ЕТ-рок	нейтрофилы
1	через 30 дней после иммунизации	Ронколейкин	М=	2,95	2,60	1,83	1,61	1,98
			m±	0,62	0,30	0,28	0,28	0,77
			Р	0,04	0,22	0,57	0,68	0,18
2		Полиоксидоний	М=	4,55	3,66	2,49	1,73	2,05
			m±	0,81	0,79	0,38	0,29	0,55
			Р	0,008	0,09	0,09	0,54	0,07
3		ПВП	М=	2,61	2,70	1,67	1,94	1,94
			m±	0,40	0,38	0,22	0,49	0,84
			Р	0,03	0,21	0,88	0,44	0,23
4		БЦЖ	М=	1,91	2,95	2,58	1,68	3,81
			m±	0,36	0,92	0,69	0,34	1,06
			Р	0,19	0,36	0,23	0,61	0,02
5		контроль	М=	1,33	1,99	1,62	1,38	0,82
			m±	0,17	0,32	0,22	0,45	0,08
1	через 30 дней после инфицирования	Ронколейкин	М=	4,39	3,41	3,49	1,46	1,17
			m±	0,82	0,22	0,80	0,28	0,28
			Р	0,04	0,43	0,97	0,09	0,06
2		Полиоксидоний	М=	3,45	3,73	4,55	1,23	1,26
			m±	0,66	1,39	0,97	0,20	0,41
			Р	0,13	0,73	0,41	0,15	0,10
3		ПВП	М=	2,39	3,15	2,46	0,94	1,23
			m±	0,40	0,39	0,39	0,16	0,23
			Р	0,64	0,34	0,28	0,72	0,07
4		БЦЖ	М=	3,77	3,49	2,62	1,99	2,02
			m±	0,30	1,09	0,30	0,38	0,76
			Р	0,01	0,59	0,34	0,02	0,44
5		контроль	М=	2,12	4,38	3,45	0,87	2,87
			m±	0,38	1,13	0,76	0,09	0,73

ный интерлейкин-2 человека (ИЛ-2), который способен усиливать пролиферацию Т-лимфоцитов и последующий синтез ИЛ-2, дифференцировку и активацию В-лимфоцитов и макрофагов. Полиоксидоний – иммуномодулятор химического синтеза. Препарат способен взаимодействовать с клеточными структурами на мембране клетки и является эффективным средством при различных формах вторичных иммунодефицитов, стимулирует продукцию цитокинов, усиливает реакции гуморального и клеточного иммунитета. Поливинилпирролидон (ПВП) с молекулярной массой 12600±2700 – синтетический неприродный полиэлектролит, модулирующий иммуногенез, обладает митогенными свойствами, стимулирует миграцию стволовых клеток.

15-ти морским свинкам ввели толераген и разделили на 3 группы: 1-я группа – 5-ти морским свинкам через 3 дня после толерогенной обработки подкожно ввели ронколейкин трижды с интервалом 24 часа в дозе по 3,5 тыс. ЕД в 0,2 мл физиологического раствора (общая доза на животное – 10,5 тыс. ЕД); 2-ая – 5 животным ввели внутримышечно полиоксидоний трижды по 0,06 мг в 0,2 мл физиологического раствора (общая доза на животное 0,18 мг); 3-я – 5-ти животным ввели поливинилпирролидон (ПВП) по 5 мг на животное в 1 мл физиологического раствора (кратность и

Таблица 3

Результаты оценки иммуномодулирующих свойств препаратов на толерантных морских свинках

Группа животных	Кожная аллергическая реакция через 30 дней после заражения, мм			Степень пораженности органов, в баллах, М±m	Индекс защиты, %
	n	Реагировало	М±m		
Ронколейкин-2	5	5	13,2±1,02	1,2±0,73	79
Полиоксидоний	4	4	13,0±1,78	3,25±0,25	43
ПВП	5	5	10,6±1,12	3,0±0,77	48
Вакцина БЦЖ	5	5	12,0±0,63	2,2±0,97	67
Контроль	4	3	12,25±4,11	5,75±1,03	0

дозы препаратов соответствуют инструкции по их применению). Через 10 дней после введения иммуномодуляторов морских свинок иммунизировали вакциной БЦЖ внутрикожно в дозе 0,1 мг в 0,1 мл физиологического раствора; 4-я группа – 5 здоровых интактных морских свинок также были привиты вакциной БЦЖ; 5-я – 4 интактные морские свинки, которых инфицировали вирулентной культурой M. bovis подкожно в дозе 0,0001 мг в 1 мл физиологического раствора. Одновременно инфицировали морских свинок всех опытных групп.

Результаты по изучению числа иммунокомпетентных клеток у морских свинок после вакцинации и заражения вирулентной культуры микобактерий показаны в таблице 2.

Иммунологическая перестройка в организме морских свинок через 30 дней после вакцинации сопровождается увеличением числа иммунокомпетентных клеток, при этом высокой степени достоверности достигает увеличение числа Т-лимфоцитов у животных всех групп, кроме 4-й группы.

Через 30 дней после инфицирования также отмечают увеличение у морских свинок числа Т-лимфоцитов, однако достоверных различий оно достигает у животных, которым вводили ронколейкин и вакцину БЦЖ.

Из таблицы видно, что оценку иммуномодулирующих препаратов возможно провести, определяя наиболее активные в иммунном ответе иммунокомпетентные клетки, это затрудняет проводить оценку эффективности каждого иммуномодулирующего средства в сравнительном аспекте. Затраты на одно исследование дороже предлагаемого нами способа.

Для проведения исследования использовали этих же морских свинок, которых через 30 дней после инфицирования убили, провели патологоанатомические исследования и оценили степень пораженности внутренних органов животных и индекс защиты.

Из таблицы 3 видно, что ронколейкин является наиболее эффективным препаратом для восстановления иммунологической реактивности (индекс защиты 79%), ПВП и полиоксидоний (соответственно: 48 и 43%).

Таким образом, сущность оценки иммуномодулирующих препаратов на способность их восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность заключается в том, что индуцируют иммунологическую толерантность аллергеном (ППД-туберкулин для млекопитающих, инкубированный с формалином) у морских свинок подкожно в дозе 1,3-1,8 мл на животное, затем через 3-5 дней параэнтерально вводят изучаемый препарат для восстановления утраченной иммунологической реактивности, затем через 7-10 дней иммунизируют морских свинок вакциной БЦЖ внутрикожно в дозе 0,1 мг, через 30 дней заражают вирулентной культурой микобактерий M.bovis подкожно в дозе 0,0001 мг, через 30 дней проводят убой морских свинок и по результатам патологоанатомического исследования оценивают иммуномодулирующие свойства изучаемых препаратов по индексу защиты - от 67% до 100% – высокая способность иммуномодулирующего средства, 43-66% – средняя способность, от 42% и меньше – низкая.

Результаты показали, что предлагаемый способ оценки иммуномодулирующих свойств препаратов предпочтительно использовать, как экономически выгодный и более точный.

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе представлена оценка иммуномодулирующих свойств известных препаратов на способность их восстанавливать утраченную иммунологическую реактивность. Установлено, что наиболее эффективным препаратом в этом отношении является ронколейкин (индекс защиты 79%). Также показано, что определение количества наиболее активных в иммунном ответе иммуно-

компетентных клеток в крови морских свинок не позволяет оценить степени эффективности каждого иммуномодулирующего средства в отдельности.

SUMMARY

In this article it is submitted the estimation immunomodulating properties of known preparations on its ability to restore lost immunological reactivity. It is established that the most effective preparation in this respect is roncoleukinum (an index of protection of 79%). Also it is shown that definition of the most active in the immune answer immunocompetent cells in blood of guinea-pigs does not allow estimating a degree of efficiency of everyone immunomodulating means separately.

Литература

1. С.И. Гельберг, Е.А. Финкель. К методике экспериментального изучения иммуногенных свойств противотуберкулезных вакцин и эффективность методов их применения. Пробл. туберкулеза. 1959, № 2. С. 80–84.
2. А.А. Евглевский. Способ подавления повышенной чувствительности животных при введении туберкулина или малеина. Патент SU № 1825630, кл. А 61К 39/35, 1993.
3. Ю.Н. Федоров, О.А. Верховский. Иммунодефициты домашних животных. М.: 1996, 96 с.
4. Л.Н. Фонталин, Л.А. Певницкий. Иммунологическая толерантность. М.: Медицина, 1978. С. 165–176.

УДК 576.8:616-002.5

З.Г. Воробьева, М.А. Кульчицкая, К.Н. Слинина, А.Л. Лазовская

ГНУ Научно-исследовательский ветеринарный институт

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИКОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К МИКОБАКТЕРИЯМ ТУБЕРКУЛЕЗА

Широко известна эффективность применения различных пробиотиков для профилактики и коррекции дисбиозов у людей и животных, вызванных многими патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. В процессе жизнедеятельности бактерии-пробионты вырабатывают комплекс биологически активных соединений, избирательно воздействующих на болезнетворные бактерии. Например, лизоцим резко снижает способность грамотрицательных бактерий к делению и размножению, молочная кислота замедляет их рост, перекись водорода разрушает их клеточную стенку. Бактериоцины обладают бактериостатистическим действием на грамотрицательную и грамположительную флору. По силе воздействия на негативную кишечную микрофлору, а также на микрофлору влагалища препараты из живых бактерий могут быть альтернативой антибиотикам. Дополнительным механизмом, усиливающим защитные свойства пробиотиков является обмен сигнальными молекулами с иммунокомпетентными клетками слизистых оболочек, стимулирующий продукцию секреторного иммуноглобулина А, комплемента, лизоцима и блокирующий прикрепление патогенных бактерий к поверхности слизистой [1, 3, 4].

В ветеринарии назрела необходимость применения пробиотиков с антагонистическими свойствами против микобактерий туберкулеза в связи с тем, что молодняк скота обычно заражается туберкулезом алиментарным путем в первые дни жизни.

В литературе хорошо освещены различные методы изучения антагонистического действия пробиотиков на различные бактриальные патогены. Чаще всего культуры засевают на чашки Петри с питательным агаром перпендикулярными штрихами или перекрещивающимися каплями. Существенно отличаются и критерии оценки полученных результатов, но чаще всего о степени антагонистической активности бактерий судят по величине зоны задержки роста индикаторных микробов. Значительно реже оценивается количество индикаторных бактерий (КОЕ) , на которое представители пробиотиков оказывают ингибирующее действие. Поэтому данные, получаемые различными авторами при изучении микробного антагонизма не всегда однозначны [2].

Трудность изучения антагонизма пробиотиков и патогенных микобактерий заключается в особенностях биологии этих видов: очень медленный рост и особые требования к средам затрудняют их одновременное выращивание.

Целью данного исследования явилась